

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
**INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
 PARIS

⑪ N° de publication : **2 734 840**

(à n'utiliser que pour les  
 commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **95 06800**

⑬ Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/53, 15/82, 5/10, A 01 H 5/00(C 12 N 15/53,  
 C 12 R 1:01, 1:29)

⑭

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 02.06.95.

⑯ Priorité :

⑰ Date de la mise à disposition du public de la  
 demande : 06.12.96 Bulletin 96/49.

⑱ Liste des documents cités dans le rapport de  
 recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
 présent fascicule.*

⑲ Références à d'autres documents nationaux  
 apparentés :

⑳ Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —  
 FR.

㉑ Inventeur(s) : SAILLAND ALAIN, ROLLAND ANNE,  
 MATRINGE MICHEL et PALLETT KEN.

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire :

㉔ GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE PLANTES CONTENANT CE  
 GENE RESISTANTES AUX HERBICIDES.

㉕ Gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et ob-  
 tention de plantes contenant ce gène, résistantes aux her-  
 bicides.

1. Gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase
2. Isolement à partir de *Pseudomonas* sp.
3. Utilisation pour l'obtention de plantes résistantes aux  
 herbicides.

FR 2 734 840 - A1



1

Gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant ce gène résistantes aux herbicides.

5 La présente invention concerne le gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), un gène chimère contenant ce gène comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

On connaît certains herbicides tel que l'isoxaflutol, herbicide sélectif du maïs, de la famille des isoxazoles ou encore la sulcotrione de la famille des tricétones. Cependant  
10 aucun gène de résistance à de tels herbicides n'a été décrit.

L'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation du para-hydroxy phénylpyruvate en homogénisate.

Par ailleurs la séquence en acides aminés de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase issue de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 a été décrite, sans qu'il y ait une  
15 description de son rôle dans la résistance des plantes aux herbicides (RüETSCHI et col: Eur. J. Biochem. 205, 459-466, 1992). Ce document ne donne pas de description du gène de la protéine.

Il a maintenant été découvert la séquence d'un gène de ce type et qu'un tel gène pouvait, une fois incorporé dans des cellules végétales, fournir des plantes présentant une  
20 résistance intéressante à certains herbicides récents, tels que ceux de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones.

La présente invention a donc pour objet un gène de résistance à un herbicide, caractérisé en ce qu'il exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD). Celui-ci peut être d'origine quelconque mais est de préférence d'origine bactérienne, telle que  
25 notamment le genre *Pseudomonas* ou encore d'origine végétale.

L'invention comprend également un procédé d'isolement du gène ci-dessus, caractérisé en ce que:

- on choisit, comme amorces, quelques oligonucléotides issus de la séquence en acides aminés d'une HPPD,
- 30 - à partir de ces amorces, on synthétise des fragments d'amplification par PCR
- on isole le gène par création et criblage d'une banque génomique et
- on clone le gène.

De préférence on utilise des amorces issues de la séquence de l'HPPD d'une bactérie du genre *Pseudomonas*. De manière particulièrement préférée, elles sont issues de  
35 *Pseudomonas fluorescens*.

Ce gène peut être utilisé dans un procédé pour la transformation des plantes comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une

résistance à certains herbicides. Il peut également être utilisé en association avec d'autres gènes marqueurs et/ou séquence codante pour une propriété agronomique.

La transformation des cellules végétales peut être obtenu par tout moyen connu approprié. Une série de méthodes consiste à bombardier des cellules ou des protoplastes avec  
5 des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN.

Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante d'un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

La présente invention a encore pour objet un gène chimère comprenant, dans le sens  
10 de la transcription, au moins une séquence de régulation promotrice, une séquence codante hétérologue qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et au moins une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation.

Comme séquence de régulation promotrice on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine  
15 bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou de celui d'un gène de l' $\alpha$  tubuline ( Demande européenne EP n° 0 652 286), ou encore d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), mais tout promoteur convenable connu peut être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de  
20 régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP 0507698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur  
25 et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription "enhancer", comme par exemple l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV) décrit dans la demande WO87/07644, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal  
30 codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. constituée d'une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale,  
35 tels que décrit dans la demande européenne n° 0 508 909.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur

nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP n° 0 633 317.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales, de plantes monocotylédones ou dicotylédones, notamment des cultures, transformées selon l'un des procédés décrits ci-dessus et contenant dans leur génome une quantité efficace d'un gène exprimant l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD). On a observé que des plantes transformées de cette façon présentent une résistance importante à certains herbicides récents tels que ceux de la famille des isoxazoles et notamment du 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole, ou encore de celle des tricétones, comme par exemple la sulcotrione.

L'invention a enfin pour objet un procédé de désherbage de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un herbicide de ce type, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention.

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Exemple 1: Isolement du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 (publié par Rüetschi U. et al. 1992. Eur. J. Biochem. 205: 459-466), on déduit la séquence de différents oligonucléotides pour amplifier par PCR une partie de la séquence codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 (isolée par McKellar, R.C. 1982. J. Appl Bacteriol. 53:305-316). Un fragment d'amplification du gène de cette HPPD a été utilisé pour cribler une banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et ainsi isoler le gène codant pour cette enzyme.

A) Préparation de l'ADN génomique de *P. fluorescens* A32.

La bactérie a été cultivée dans 40 ml de milieu minimum M63 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,6g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,2g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,005 g/l pH7 plus L-tyrosine 10mM comme seule source de carbone) à 28°C pendant 48 heures.

Après lavage, les cellules sont reprises dans 1 ml de tampon de lyse (tris HCl 100 mM pH 8,3, NaCl 1,4 M et EDTA 10 mM) et incubées 10 minutes à 65°C. Après un traitement au phénol/chloroforme (24/1) et un traitement au chloroforme, les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol puis repris dans 300 µl d'eau stérile et traités à la RNase 10 µg/ml final. l'ADN est de nouveau traité au phénol/chloroforme, chloroforme et reprécipité par addition de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH5 et 2 volumes d'éthanol. l'ADN est ensuite repris dans de l'eau stérile et dosé.

B) Choix des oligonucléotides et synthèses.

A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 on choisit cinq oligonucléotides, deux dirigés dans le sens NH<sub>2</sub> terminal de la protéine vers le

COOH terminal de la protéine et trois dirigés dans le sens inverse (voir SEQ. ID N°1 . Le choix a été dicté par les deux règles suivantes:

-une extrémité 3' de l'oligonucléotide stable, c'est à dire au moins deux bases sans ambiguïté.

5 -une dégénérescence la plus faible possible.

Les oligonucléotides choisis ont les séquences suivantes:

P1: 5'TA(C/T)GA(G/A)AA(C/T)CCATGGG3'

P2: 5'GA(G/A)ACIGGICCIATGGA3'

P3: 5'AA(C/T)TGCATIA(G/A)(G/A)AA(C/T)TC(C/T)TC3'

10 P4: 5'AAIGCIAC(G/A)TG(C/T)TG(T/G/A)ATICC3'

P5: 5'GC(C/T)TT(A/G)AA(A/G)TTICC(C/T)TCICC3'

Ils ont été synthétisés sur le synthétiseur "Cyclone plus DNA Synthesizer" de marque MILLPORE.

15 Avec ces cinq oligonucléotides par PCR les fragments d'amplification que l'on doit obtenir théoriquement d'après la sséquence SEQ ID N°1 ont les tailles suivantes:

avec les amorces P1 et P3 -----> environ 690 bp

avec les amorces P1 et P4 -----> environ 720 bp

avec les amorces P1 et P5 -----> environ 1000 bp

avec les amorces P2 et P3 -----> environ 390 bp

20 avec les amorces P2 et P4 -----> environ 420 bp

avec les amorces P2 et P5 -----> environ 700 bp

C) Amplification d'une partie codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

25 Les amplifications ont été faites sur un appareil PCR PERKIN ELMER 9600 et avec la Taq polymérase PERKIN ELMER avec son tampon dans les conditions standards, c'est à dire pour 50µl de réaction il y a les dNTP à 200µM, les primers à 20µM, la Taq polymérase 2,5 unités et l' ADN de *P. fluorescens* A32 2,5 µg.

Le programme d'amplification utilisé est, 5 min à 95°C puis 35 cycles <45 sec 95°C, 45 sec 49°C, 1 min 72°C> suivis de 5 min à 72°C.

30 Dans ces conditions, tous les fragments d'amplification obtenus ont une taille compatible avec les tailles théoriques données au-dessus, ce qui est une bonne indication de la spécificité des amplifications.

Les fragments d'amplifications obtenus avec les jeux d'amorces P1/P4, P1/P5 et P2/P4 sont ligués dans pBSII SK(-) après digestion de ce plasmide par Eco RV et traitement à la terminal transférase en présence de ddTTP comme décrit dans HOLTON T.A. and  
35 GRAHAM M.W. 1991. N.A.R. vol 19, n°5 p1156.

Un clone de chacun des trois types est séquencé partiellement; ceci permet de confirmer qu'on a bien amplifié dans les trois cas une partie de la région codante de l'HPPD

de *P. fluorescens* A32. Le fragment P1/P4 est retenu comme sonde pour cribler une banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et isoler le gène complet de l'HPPD.

#### D) Isolement du gène.

5 Par Southern on montre qu'un fragment de 7 Kbp après digestion de l'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI s'hybride avec la sonde HPPD P1/P4. On a donc fait digérer 400µg d'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI et purifier sur gel d'agarose les fragments d'ADN faisant environ 7Kbp.

10 Ces fragments sont ligués dans pBSII SK(-), lui-même digéré par Bam HI et déphosphorylé par traitement à la phosphatase alcaline. Après transformation dans *E. coli* DH10b, la banque génomique partielle est criblée avec la sonde HPPD P1/P4.

Un clone positif a été isolé et appelé pRP A. Sa carte simplifiée est donnée figure 1 . Sur cette carte est indiqué la position de la partie codante du gène HPPD. Elle est composée de 1077 nucléotides qui codent pour 358 acides aminés (voir SEQ ID N° 2 ).

15 L'HPPD de *P. fluorescens* A32 présente une bonne homologie en acides aminés avec celle de *Pseudomonas* sp. strain P.J. 874, il y a en effet 92% d'identité entre ces deux protéines ( voir SEQ ID N° 3 ).

#### Exemple 2: Construction de deux gènes chimères.

20 Pour conférer la résistance de plantes aux herbicides inhibant l'HPPD, on construit deux gènes chimères:

Le premier consiste à mettre la partie codante du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 sous le contrôle du promoteur double histone (Brevet européenne N° 0 507 698) suivi du Tobacco etch virus translational enhancer (TEV) (pRTL-GUS (Carrington and

25 Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597)) avec le terminateur du gène de la nopaline synthase. L'HPPD sera alors localisée dans le cytoplasme.

Le deuxième sera identique au premier, à ceci près qu'entre activateur de transcription TEV et la partie codante de l'HPPD, on intercale le peptide de transit optimisé (OTP) (Demande européenne EP n° 0 508 909). L'HPPD sera alors localisée dans le

30 chloroplaste.

#### A) Construction du vecteur pRPA-RD-153:

- pRPA-RD-11: Un dérivé de pBS-II SK(-) (Stratagene catalog #212206) contenant le site de polyadénylation de la nopaline synthase (NOS polyA) ( Demande européenne EP n° 0 652 286) est cloné entre les sites *KpnI* et *Sall*. Le site *KpnI* est transformé en un site

35 *NotI* par traitement avec la T4 ADN polymérase I en présence de 150 µM d'adéoxynucleotide triphosphates puis ligation avec un linker *NotI* (Stratagene catalog #1029). Ainsi on obtient une cassette de clonage NOS polyA .

- pRPA-RD-127: Un dérivé de pRPA-BL-466 (Demande européenne EP n° 0 337 899) cloné dans pRPA-RD-11 créant une cassette d'expression du gène *oxy* et contenant le promoteur de la petite sous unité de la ribulose-biscarboxylase:

" promoter (SSU) - *oxy* gene - NOS polyA "

5 Pour créer ce plasmide, pRPA-BL-466 a été digéré avec XbaI et HindIII pour isoler un fragment de 1.9 kbp contenant le promoteur SSU et le gène *oxy* qui a été ligué dans le plasmide pRPA-RD-11 digéré avec des enzymes compatibles.

- pRPA-RD-132: C'est un dérivé de pRPA-BL-488 (Demande européenne EP n° 0 507 698) cloné dans pRPA-RD-127 avec création d'une cassette d'expression du gène *oxy* avec le promoteur double histone:

" promoteur double histone - *oxy* gene - NOS polyA "

Pour fabriquer ce plasmide, pRPA-BL-466 est digéré par HindIII, traité par la Klenow puis redigéré avec NcoI. Le fragment de 1.35 kbp purifié contenant le promoteur double histone H3A748 est ligué avec le plasmide pRPA-RD-127 qui avait été digéré par XbaI, traité Klenow et redigéré par NcoI.

- pRPA-RD-153: C'est un dérivé de pRPA-RD-132 contenant l'activateur de translation du virus du tabac (TEV). pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597) est digéré avec NcoI and EcoRI et le fragment de 150 bp est ligué dans pRPA-RD-132 digéré avec les mêmes enzymes. Donc on a créé une cassette d'expression contenant le promoteur:

"double histone promoter - TEV -*oxy* gene - NOS polyA"

B) Construction du vecteur pRPA-RD-185:

pUC19/GECA: Un dérivé de pUC-19 (Gibco catalog #15364-011) contenant de nombreux sites de clonage. pUC-19 est digéré avec EcoRI et ligué avec l'oligonucléotide linker 1:

Linker 1: AATTGGGCCA GTCAGGCCGT TTAAACCCTA GGGGGCCCCG  
CCCGGT CAGTCCGGCA AATTTGGGAT CCCCCGGGC TTAA

Le clone sélectionné contient un site EcoRI suivi du polylinker qui contient les sites suivants: EcoRI, ApaI, AvrII, PmeI, SfiI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI, PstI, SphI et HindIII.

pRPA-RD-185: c'est un dérivé de pUC19/GECA contenant un polylinker modifié. pUC19/GECA est digéré par HindIII et ligué avec l'oligonucléotide linker 2:

Linker 2: AGCTTTTAAT TAAGGCGCGC CCTCGAGCCT GGTTCAGGG  
AAATTA ATTCCGCGCG GGAGCTCGGA CCAAGTCCC TCGA

Le clone sélectionné contient un site *HindIII* site au milieu du polylinker qui contient maintenant les sites suivants: *EcoRI*, *ApaI*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*, *PacI*, *AscI* *XhoI* et *EcoNI*.

5 C) Construction du vecteur pRP T:

- pRP O: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - gène HPPD - terminateur Nos. Pour fabriquer pRP O, pRPA-RD153 est digéré par *Hind III*, traité par la Klenow puis redigéré par *NcoI* pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP A par digestion *BstEII*, traitement par la Klenow et redigestion par *NcoI*.

- pRP R: pour l'obtenir le plasmide pRP O a été digéré par *PvuII* et *SacI*, le gène chimère a été purifié puis ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par *PvuII* et *SacI*.

- pRP T: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP R après digestion par *SacI* et *HindIII* dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 digéré par les mêmes enzymes (Demande européenne EP n° 0 508 909).

Le gène chimère du vecteur binaire pRP T a donc la structure suivante:

Promoteur double histone	TEV	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
--------------------------	-----	--------------------------	-----------------

20 D) Construction du vecteur pRP V:

- pRP P: c'est un dérivé de pRPA-RD-7 (Demande européenne EP n° 0 652 286) contenant le peptide de transit optimisé suivi du gène de l'HPPD. Il a été obtenu par ligation de la partie codante de l'HPPD sorti de pRP A par digestion *BstEII* et *NcoI*, traitement à la Klenow et du plasmide pRPA-RD-7 lui-même digéré *SphI* et *AccI* et traité à la DNase polymérase T4.

- pRP Q: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - OTP - gène HPPD - terminateur Nos. Pour le construire le plasmide pRPA-RD-153 est digéré par *Sal I*, traité par la Klenow puis redigéré par *NcoI* pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP P par digestion *BstEII*, traitement par la Klenow et redigestion par *NcoI*.

- pRP S: pour l'obtenir, le plasmide pRP Q a été digéré par *PvuII* et *SacI* pour sortir le gène chimère qui a été ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par *PvuII* et *SacI*.



- pRP V: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP S après digestion par SacI et HindIII dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 (Demande européenne EP n° 0 508 909).

5 Le gène chimère du vecteur binaire pRP a donc la structure suivante:

Promoteur double histone	TEV	OTP	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
-----------------------------	-----	-----	--------------------------	-----------------

### Exemple 3: Transformation du tabac industriel PBD6.

10 Afin de déterminer l'efficacité de ces deux gènes chimériques, ceux-ci ont été transférés dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

#### 1) Transformation:

15 Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101(Hood et al,1987)porteuse du cosmide pTVK 291(Komari et al,1986).La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al(1985).

#### 2) Régénération:

20 La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200ug/ml de kanamycine.Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires(Science 1985,Vol 227,p.1229-1231) en trois étapes successives:la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours.Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur 25 un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours.Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours,les pousses enracinées sont passées en terre.

30 Exemple 4: Mesure de la résistance du tabac au 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.

Au sortir de l'in-vitro, les plantules de tabac transformées ont été acclimatées à la serre (60% d'humidité relative; température: 20°C la nuit et 23°C la jour) pendant cinq semaines puis traitées au 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.

- 5 Le tabac témoin, non transformé et traité au 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à des doses allant de 50 à 400 g/ha, développe en environ 72 heures des chloroses, qui s'intensifient pour évoluer vers des nécroses très prononcées en une semaine( couvrant environ 80% des feuilles terminales).

- 10 Après transformation ce même tabac, qui surexprime l'HPPD de *P. fluorescens*, est très bien protégé contre un traitement au 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à la dose de 400 g/ha.

Si l'enzyme surexprimée est dans le cytoplasme, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP T, alors la plante présente de très légères chloroses toutes localisées sur les feuilles intermédiaires.

- 15 Si l'enzyme surexprimée est dans le chloroplaste, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP V, alors la plante est parfaitement protégée, ne présente aucun symptôme.

Les séquences illustrées sont les suivantes:

SEQ. ID N° 1

- 20 Séquence protéique de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. strain P.J. 874 et la séquence nucléotidique théorique de la partie codante correspondante; les cinq oligonucléotides choisis pour faire l'amplification d'une partie de cette région codante sont symbolisés par les cinq flèches.
- 25 SEQ. ID N° 2 Séquence du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 et séquence déduite de la protéine correspondante.

SEQ. ID N° 3 :

- 30 Comparaison des séquences en acides aminés de l' HPPD de *P. fluorescens* A32 et de l'HPPD de *Pseudomonas* sp strain P.J. 874 (seuls les acides aminés divergents entre les deux séquences sont indiqués) ainsi que la séquence consensus.

La Figure 1représente la cartographie du plasmide avec le fragment d'ADN génomique de 7 kb contenant le gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

Liste de séquences  
SEQ. ID N° 1

GCNGAYTNTAYGARAAYCCNATGG GNYTNATGGGNTTYGARTTYATHGA RYTNGCNWSNCCNACNCCNAAAYACN 75  
A D L Y E N P M G L M G F E F I E L A S P T P N T  
YTNARGCCNATHTTYGARATHATGG GNTTYACNAARGTNGCNACNAYMG NWSNAARGAYGTNCAYTNTAYMGN 150  
L E P I F E I M G F T K V A T H R S K D V H L Y R  
CARGGNGCNATHAAYTNAHYTNA AYAAYGARCCNAYWSNGTNGCNWS NTAYTTYGCNGCNGARCAAYGGNCCN 225  
Q G A I N L I L N N E P H S V A S Y F A A E H G P  
WSNGTNTGYGGNATGGCNTTYMGNG TNAARGAYWSNCARAARGCNTAYAA RMGNGCNYTNGARYTNGGNGCNCAR 300  
S V C G M A F R V K D S Q K A Y K R A L E L G A Q  
CCNATHCAYATHGARACNGGNCNA TGGARYTNAAYTNCNGCNATHAA RGGNATHGGNGGNGCNCNYTNTAY 375  
P I H I E T G P M E L N L P A I K G I G G A P L Y  
YTNATHGAYMGNTTYGGNGARGGNW SNWSNATHTAYGAYATHGAYTTYGT NTYYTNGARGGNGTNGAYMGNCAY 450  
K I D R F G E G S S I Y D I D F V F L E G V D R H  
CCNGTNGGNGCNGGNYTNAARATHA THGAYCAYTNAACNAYAYGTNTA YMGNGGNGMGNATGGCNTAYTGGGNCN 525  
P V G A G L K I I D H L T H N V Y R G R M A Y W A  
AAYTTYTAYGARAARYTNTTYAAYT TYMGNGARATHMGNTAYTTYGAYAT HAARGGNGARTAYACNGGNYTNAACN 600  
N F Y E K L F N F R E I R Y F D I K G E Y T G L T  
WSNAARGCNATGACNGCNCNGAYG GNATGATHMGNATHCCNYTNAAYGA RGARWSNWSNAARGGNGCNGGNCAR 675  
S K A M T A P D G M I R I P L N E E S S K G A G Q  
ATHGARGARTTYTNTATGCARTTYA AYGGNGARGGNATHCARCAYGTNGC NTYYTNWSNGAYGAYTNTATHAAR 750  
I E E F L M Q F N G E G I Q H V A F L S D D L I K  
ACNTGGGAYCAYTNAARWSNATHG GNATGMGNTTYATGACNGCNCNCC NGAYACNTAYTAYGARATGYTNGAR 825  
T W D H L K S I G M R F M T A P P D T Y Y E M L E  
GGNMGNYTNCNAAAYCAYGGNGARC CNGTNGGNGARYTNCARGCNGMNGG NATHYTNYTNGAYGGNWSNWSGAR 900  
G R L P N H G E P V G E L Q A R G I L L D G S S E  
WSNGGNGAYAARMGNYTNYTNYTNC ARATHTTYWSNGARACNYTNTATGGG NCCNGTNTTYTGYARTTYATHCAR 975  
S G D K R L L L Q I F S E T L M G P V F F E F I Q  
MGNAARGGNGAYGAYGGNTTYGGNG ARGGNAAYTTYAARGCNYTNTTYGA RWSNATHGARMGNGAYCARGTNMGN 1050  
R K G D D G F G E G N F K A L F E S I E R D Q V R  
MGNGGNGTNYTWSNACNGAY 1071  
R G V L S T D

## SEQ. ID N° 2

ATGGCAGATCTATACGAAAACCCAA TGGGCCTGATGGGCTTTGAATTCAT CGAATTCGGCTCGCCGACGCCGGGT 75  
 M A D L Y E N P M G L M G F E F I E F A S P T P G  
 ACCCTGGAGCCGATCTTCGAGATCA TGGGCTTCACCAAAGTCGCGACCCA CCGTTCCAAGAACGTGCACCTGTAC 150  
 T L E P I F E I M G F T K V A T H R S K N V H L Y  
 CGCCAGGGCGAGATCAACCTGATCC TCAACAACGAGCCCAACAGCATCGC CTCCTACTTTGCGGCCGAACACGGC 225  
 R Q G E I N L I L N N E P N S I A S Y F A A E H G  
 CCGTCGGTGTGCGGCATGGCGTTCC GCGTGAAGGACTCGCAAAGGCCTA CAACCGCGCCCTGGAAGTGGCGGCC 300  
 P S V C G M A F R V K D S Q K A Y N R A L E L G A  
 CAGCCGATCCATATTGACACCGGGC CGATGGAATTGAACCTGCCGGCGAT CAAGGGCATCGGGCGCGCCGTTG 375  
 Q P I H I D T G P M E L N L P A I K G I G G A P L  
 TACCTGATCGACCGTTTCGGCGAAG GCAGCTCGATCTACGACATCGACTT CGTGACCTCGAAGGTGTGGAGCGC 450  
 Y L I D R F G E G S S I Y D I D F V Y L E G V E R  
 AATCCGGTCGGTGCAGGTCTCAAAG TCATCGACCACCTGACCCACAACGT CTATCGCGGCCCATGGTCTACTGG 525  
 N P V G A G L K V I D H L T H N V Y R G R M V Y W  
 GCCAACTTCTACGAGAAATTGTCA ACTTCCGTGAAGCGCGTTACTTCGA TATCAAGGGCGAGTACACCGGCTG 600  
 A N F Y E K L F N F R E A R Y F D I K G E Y T G L  
 ACTTCCAAGGCCATGAGTGGCCCG ACGGCATGATCCGCATCCCGCTGAA CGAAGAGTCGTCCAAGGGCGCGGGG 675  
 T S K A M S A P D G M I R I P L N E E S S K G A G  
 CAGATCGAAGAGTTCCTGATGCAGT TCAACGGCGAAGGCATCCAGCACGT GGC GTTCTCACCAGACGACCTGGTC 750  
 Q I E E F L M Q F N G E G I Q H V A F L T D D L V  
 AAGACCTGGGACGCGTTGAAGAAAA TCGGCATGCGCTTCATGACCGCGCC GCCAGACACTTATTACGAAATGCTC 825  
 K T W D A L K K I G M R F M T A P P D T Y Y E M L  
 GAAGGCCGCTGCCTGACCACGGCG AGCCGGTGGATCAACTGCAGGCACG CGGTATCCTGCTGGACGGATCTTCC 900  
 E G R L P D H G E P V D Q L Q A R G I L L D G S S  
 GTGGAAGGCGACAAACGCCTGCTGC TGCAGATCTTCTCGGAAACCTGAT GGGCCCGGTGTTCTTGAATTCATC: 975  
 V E G D K R L L L Q I F S E T L M G P V F F E F I  
 CAGCGCAAGGGCGACGATGGGTTTG GCGAGGGCAACTTCAAGGCGCTGTT CGAGTCCATCGAACGTGACCAGGTG 1050  
 Q R K G D D G F G E G N F K A L F E S I E R D Q V  
 CGTCGTGGTGATTGACCGCCGATT AA 1077  
 R R G V L T A D .

## SEQ. ID N° 3

Consensus	.ADLYENPMG	LMGFEFIE.A	SPTP.TLEPI	FEINGFTKVA	THRSK.VHLY	50
P. fluorescens	M.....	.....F.	....G.....	.....	.....N....	50
Pseudomonas sp.	-.....	.....L.	....N.....	.....	.....D....	49
Consensus	RQG.INLILN	NEP.S.ASYF	AAEHGPSVCG	MAFRVKDSQK	AY.RALELGA	100
P. fluorescens	...E.....	...N.I....	.....	.....	..N.....	100
Pseudomonas sp.	...A.....	...H.V....	.....	.....	..K.....	99
Consensus	QPIHI.TGPM	ELNLPAIKGI	GGAPLYLIDR	FGEGSSIIDY	DFV.LEGV.R	150
P. fluorescens	.....D....	.....	.....	.....	...Y....E.	150
Pseudomonas sp.	.....E....	.....	.....	.....	...F....D.	149
Consensus	.PVGAGLK.I	DHLTHNVYRG	RM.YWANFYE	KLFNFRE.RY	FDIKGEYTGL	200
P. fluorescens	N.....V.	.....	..V.....	.....A..	.....	200
Pseudomonas sp.	H.....I.	.....	..A.....	.....I..	.....	199
Consensus	TSKAM.APDG	MIRIPLNEES	SKGAGQIEEF	LMQFNQEGIQ	HVAFL.DDL.	250
P. fluorescens	.....S....	.....	.....	.....	.....T...V	250
Pseudomonas sp.	.....T....	.....	.....	.....	.....S...I	249
Consensus	KTWD.LK.IG	HRFMTAPPDT	YYEMLEGRLP	.HGEPV..LQ	ARGILLDGSS	300
P. fluorescens	....A..K..	.....	.....	D.....DQ..	.....	300
Pseudomonas sp.	....H..S..	.....	.....	N.....GE..	.....	299
Consensus	..GDKRLLQ	IFSETLMGPV	FFEFIQRKGD	DGFGEGNFKA	LFESIERDQV	350
P. fluorescens	VE.....	.....	.....	.....	.....	350
Pseudomonas sp.	ES.....	.....	.....	.....	.....	349
Consensus	RRGVL..D					358
P. fluorescens	.....TA.					358
Pseudomonas sp.	.....ST.					357

## Revendications

1. Gène caractérisé en ce qu'il exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).
2. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est d'origine bactérienne
3. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est issu de *Pseudomonas* sp.
4. Gène selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est issu de *Pseudomonas fluorescens*.
5. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est d'origine végétale
6. Procédé d'isolement du gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que:
  - on choisit, comme amorces, quelques oligonucléotides issus de la séquence en acides aminés d'une HPPD .
  - à partir de ces amorces, on synthétise des fragments d'amplification par PCR
  - on isole le gène par création et le criblage d'une banque génomique et
  - on clone le gène.
7. Procédé d'isolement du gène selon la revendication 6, caractérisé en ce que les amorces sont issus de l'HPPD d'une bactérie du genre *Pseudomonas*.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'HPPD est issue de *Pseudomonas fluorescens*.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'HPPD est issue de *Pseudomonas fluorescens* A32.
10. Gène chimère pour la transformation génétique des plantes comprenant, dans le sens de la transcription:
  - au moins une séquence de régulation promotrice issu d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes,
  - une séquence codante hétérologue,
  - au moins une séquence de polyadénylation,

caractérisé en ce que la séquence codante est un gène qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).

11. Gène chimère selon la revendication 10, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice favorise la surexpression de la séquence codante.
12. Gène chimère selon la revendication 11, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice comprend au moins un promoteur d'histone.
13. Gène chimère selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit.
14. Gène chimère selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit optimisé comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.
15. Gène chimère selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisée en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, une séquence de activateur de transcription "enhancer".
16. Vecteur utilisable pour la transformation génétique des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 10 à 15.
17. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène chimère selon l'une des revendications 10 à 15.
18. Plante, caractérisée en ce qu'elle est régénérée à partir de cellules selon la revendication 17.
19. Procédé de transformation de plantes pour les rendre résistantes aux inhibiteurs de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale un gène selon l'une des revendications 1 à 5.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le transfert est effectué avec *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*
21. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le transfert est effectué par apport par bombardement à l'aide de particules chargées de l'ADN.
22. Utilisation d'un gène selon l'une des revendications 1 à 5 comme marqueur de sélection.
23. Procédé de traitement herbicide sélectif de plantes, caractérisé en ce qu'on applique un inhibiteur du gène l'HPPD à une plante selon la revendication 22.
24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est un isoxazole.
25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'isoxazole est le 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.
26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est une tricétone.
27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est la sulcotrione.



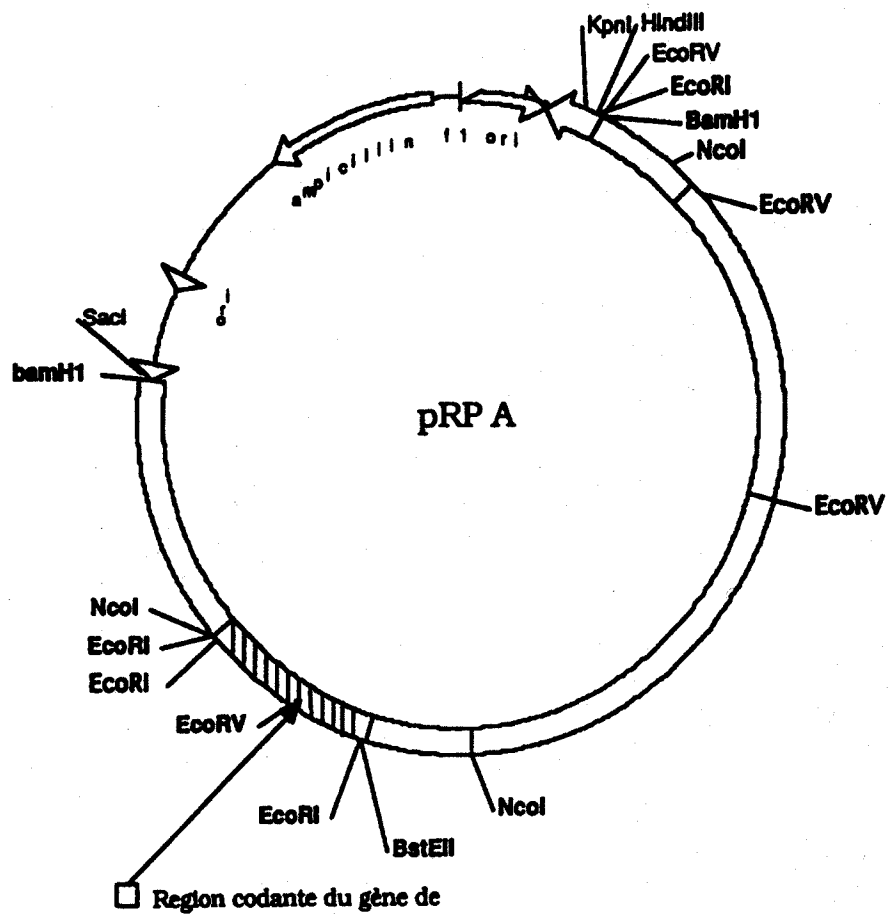


Fig. 1/1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY 176 (17). 1994. 5312-5319., DENOYA C. D., ET AL. 'A Streptomyces avermitilis gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in Escherichia coli.' * le document en entier *	1,2
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 34, 5 Décembre 1992 pages 24235-24240, ENDO, F., ET AL. 'Primary structure deduced from complementary DNA sequence and expression in cultured cells of mammalian 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxxygenase' * le document en entier *	1
Y	---	6,10-27
X	GENE, vol. 109, 1991 pages 131-136, FUQUA, W.C., ET AL. 'Characterization of melA: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium Shewanella colwelliana' * le document en entier *	1,2
Y	---	3,4,7-9
Y	EUR J BIOCHEM 205 (2). 1992. 459-466, RUETSCHI U., ET AL. 'CHARACTERIZATION OF 4 HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE PRIMARY STRUCTURE OF THE PSEUDOMONAS ENZYME.' * le document en entier *	3,4,7-9
		--/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 Février 1996		Maddox, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		
A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général		
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention		
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.		
D : cité dans la demande		
L : cité pour d'autres raisons		
& : membre de la même famille, document correspondant		

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL SECOND EDITION., 1989 pages 14.7-14.8, SAMBROOK, J., ET AL. 'Generation of probes specific for uncloned genes by selective amplification of particular segments of cDNA' * le document en entier *	6-9
Y	EP-A-0 652 286 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 10 Mai 1995 * page 7, ligne 35 - ligne 47 *	10-27
X	GENOMICS (1994), 23(3), 534-9, AWATA, HISATAKA., ET AL. 'Structure of the human 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene (HPD)' * le document en entier *	1
A	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 124 (2). 1994. 179-184., RUZAFI C., ET AL. 'The protein encoded by the Shewanella colwelliana mela gene is a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase' * le document en entier *	2
A	FEBS LETTERS, vol. 318, no. 2, Mars 1993 AMSTERDAM NL, pages 162-166, SCHULZ, A., ET AL. 'SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase' * le document en entier *	10-27
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 Février 1996		Maddox, A
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1500 QLR (P0413)

**INSTITUT NATIONAL**  
**de la**  
**PROPRIETE INDUSTRIELLE**

# RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

2734840

N° d'enregistrement  
national

FA 515088  
FR 9506800

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP-A-0 507 698 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 Octobre 1992 * le document en entier * ---	12
A	EP-A-0 508 909 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 Octobre 1992 * le document en entier * -----	14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
5 Février 1996		Maddox, A
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons</p> <p>.....  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		